

動物の“正直シグナル”の正体をさぐる

The making of reliable signal in animal ornament

(日本動物学会推薦)

代表研究者 東京大学 岡田泰和 The University of Tokyo Yasukazu OKADA

協同研究者 モンタナ大学 Douglas J. Emlen

東京大学 香月雅子 The University of Tokyo Masako KATSUKI

Nutritional conditions during early development often influence the plastic expression of adult phenotypes. The development of sexual ornaments has striking nutrition sensitivity, resulting in the positive allometry and hypervariability distinct from other traits. Using *de novo* RNA sequencing, we identified a subset of nutrient-sensing genes and epigenetic regulatory genes in our model animal *Gnatocerus cornutus* (broad horned flour beetle). Using larval RNAi, we have shown that one specific type of insulin-like peptide strikingly changes the size of mandibles, i.e. the weapon in males. Gene-knockdown (RNAi) for epigenetic modifying factors in final instar larvae revealed that histone deacetylase (HDAC) preferentially influence the mandible size (exaggerated male ornament). RNAi-mediated HDAC1 knockdown in *G. cornutus* larvae caused specific curtailment of mandibles in adults, whereas HDAC3 knockdown led to hypertrophy of mandibles. Notably, these knockdowns conferred opposite effects on wing size, but little effect on the sizes of other body modules such as genitalia. These results suggest that the plastic development of exaggerated traits is controlled in a module-specific manner by epigenetic mechanisms associated with histone modification. We propose that nutrient-sensing mechanism and epigenetic mechanism may work together to generate weapon-specific nutrition sensitivity.

研究目的

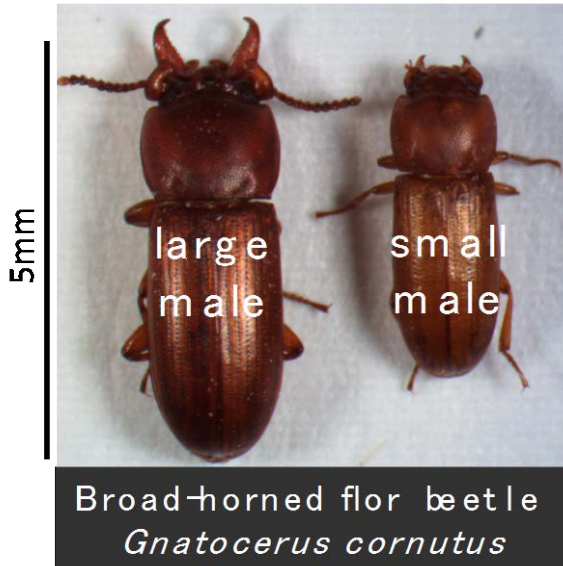
動物の角や大顎、美しい羽といった装飾形質には顕著な個体変異があり、栄養条件が良く大きなサイズのオスほど、不釣り合いなまでに大きな装飾を発達させる傾向がある。カブトムシやシカに見られるような武器はその好例で、大きな個体ほど不釣り合いなまでにサイズの大きな武器を発達させることで、個体の質を“正直に”伝えるシグナル形質としての役割を果たしている。これと相反し、体サイズが大きく変わっても器官サイズがあまり変化しない安定な形質も存在する。脊椎動物の脳や昆虫の交尾器などは生育時の栄養条件によらずほぼ一定の器官サイズに成長するため、環境からの影響をうまく緩和するような発生プロセスを備えているといえる。つまり、発生過程における環境からの影響の受けやすさは、体の器官や部位ごとに大きく異なっている (Emlen et al. 2012)。

このように、武器となる器官は非常に大きな栄養応答性とバリエーション（形態変異）を示す。この特徴は、性選択において個体の質を伝える重要な性質だが、武器特異的な発達が生じる発生や遺伝のメカニズムはよくわかっていない。そこで、私は昆虫の武器に注目して形態変異の作出メカニズムの解明を目指している。

オオツノコクヌストモドキというコムギなどにつく、5mmほどの甲虫は、オスの大顎が前方に発達し、オスがなわばりやメスをめぐって争うための武器を持つ。本種は幼虫期の栄養の量を操作すると、武器の大きな大型のオスと、武器の微小な小型のオスを作出することができ、環境要因によって形態変異が生じることがすでにわかっている (Fig. 1)。本種は大量飼育や遺伝子操作が可能であることから、私はこのオオツノコクヌストモドキ、*Gnatocerus cornutus* を

主なモデル種として、オスの大顎に大きなバリエーションが生まれる遺伝基盤の解析を行う。

Fig.1 Broad-horned flour beetle



本研究では、1) 体内の栄養条件をモニターするインスリン経路の機能解析、2) 生育時の栄養条件によって発現が変化する遺伝子の網羅的探索、3) 遺伝子の発現パターンを大局的に制御するしくみであるエピゲノム機構、の3点に特に注目して研究をすすめた。

研究経過

1) 栄養応答因子であるインスリン経路の機能解析
 カブトムシを用いた先行研究で、ある種のインスリン受容体を幼虫期に発現抑制することで、角のサイズが縮小することが知られており、角発達の栄養応答性を司る仕組みとして重要視されている(Emlen et al. 2012)。オオツノコクヌストモドキの武器は大顎が前方に伸長したものであり、頭部の表皮が伸長したカブトムシの角とは発生的な起源が異なる。独立に進化した異なる武器であっても、インスリン経路が共通して使われているのかを調べるため、オオツノコクヌストモドキ（以下オオツノ）において、インスリン受容体およびインスリン様ペプチドの武器形成における機能を調べた。次世代シーケンサーによる発現遺伝子解析(RNAseq)により、オオツノには5種類のペプチドおよび、3種類の受容体が存在することがわかった。これらのペプチドと受容体の遺伝子について、二本鎖 RNA の幼虫期の注入(RNAi)に

よるノックダウン (KD) を行い、大顎発達への影響を調べたところ、インスリン様ペプチドの A タイプ (ILPA) のノックダウン(KD)によって、大顎サイズが50%ほど小さくなることがわかった(Fig.2)。頭部や胸部、鞘翅長など様々な部位を計測、定量した結果、頭部の幾つかの部位では最大で 25%ほど減少が見られたが、大顎サイズへの影響が最も顕著であった。B-C の他のペプチドの KD は大顎を含め、外部形態への影響は検出されなかった。一方、受容体は3タイプ全てが大顎サイズに影響したが、特にタイプ1受容体 (InR1) の KD によって大顎サイズが25%ほど減少した。

これらの結果から、インスリン経路は発生上の起源が異なる武器であっても、栄養特異的発達を制御していることが明らかになった

Fig.2 Knockdown phenotype of ILPA



Control (dsGFP)

Insulin-like Peptide A (dsILPA)



OVA

2) 栄養条件によって発現が変化する遺伝子の探索
 オオツノコクヌストモドキでは、ゲノム情報などが得られないため、新たに遺伝子配列情報を取得する必要があった。そこで、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子解析(RNAseq)を行い、本種の幼虫期から成虫期で発現する遺伝子配列を得た。さらに、栄養条件によって発現が変化する遺伝子を特定するため、体サイズごとにオス幼虫を分け(5mg 以上を大型オス、4.5mg 以下を小型オスと定義), 頭部における遺伝子発現を比較した。その結果、前蛹期 1 日目、2 日目を通じて、大小のオスで発現が変化している遺伝子を約 300 個特定した。これらの発現変動遺伝子を機能ごとにまとめてパターンを解析すると、栄養応答にかかわる経路(インスリン経路、AMPK 経路、PI3K-Akt 経路)が高頻度で発現を変えていることが明らかになり、本経路が栄養に応答した武器形成にかかわることが支持された。この他に、脂質や糖の代謝因子群、細胞接着因子群など、武器の発達に参与する新たな候補遺伝子を得ることができた。

3) 武器サイズ可塑性のエピゲノム制御

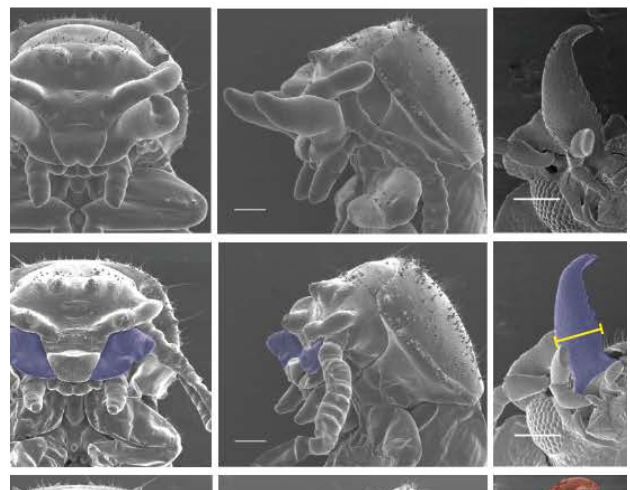
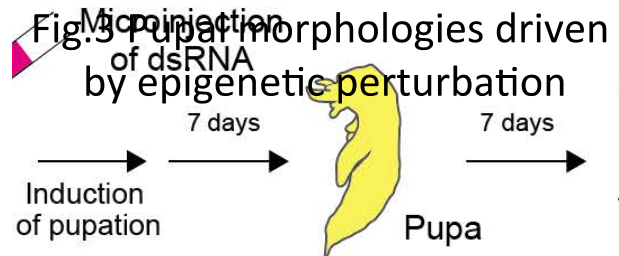
器官の発生可塑性において、細胞状態の可塑性を規定するエピゲノム機構が関与するという予想を立てた。DNA やヒストンタンパクなどゲノム情報に化学的修飾がつけられることで細胞が発現できる遺伝子のレパートリーが決まる。異なる形やサイズの大顎を発達させる上では、異なる遺伝子セットが使われている、と考えられるため、遺伝子発現パターンを大局的に制御するエピゲノムの仕組みが介在している可能性がある。

オオツノコクヌストモドキにおいて、大顎だけでなく脚や翅、交尾器など様々な器官の相対成長パターン(体サイズの増加に対し器官サイズがどれくらい増加するかを、体サイズ-各形質の対数プロットで表現する、アロメトリともいわれる)を調べると、大顎は最も傾きが大きく、交尾器がもっとも小さな傾きを示し、脚や翅は中間的な(1に近い)傾きの値となった。このことは、大顎>脚・翅>交尾器の順に環境への応答性が高く“変化しやすい”形質であることを示している(Ozawa, Okada et al. 2016, Fig1 参照)。この変化のしやすさが、細胞や器官のエピゲノム状態の変化のしやすさと関連していると考え、エピゲノム状態に人為的に摂動を加え、器官発生への影響の大きさを調べることで、エピゲノム

状態への摂動の部位ごとの効果を検証した。

上記の RNAseq で得られた配列の中から、DNA メチル化やヒストンアセチル化にかかわるエピジェネティック因子をコードする遺伝子を特定し、HDAC, DNMT などの 12 の遺伝子を蛹になる直前の幼虫でノックダウンし、生じてくる成虫の表現型を計測した。なお、本種では RNAi が非常に有効で、幼虫の腹部背面への注射による RNAi は全身での遺伝子ノックダウン効果をもたらすため、全ての器官でノックダウンを施すことができる。

ノックダウン(KD)実験の結果、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 および HDAC3 が蛹や成虫の表現型に顕著な影響を与えた(Fig. 3)。HDAC1 の KD は大顎サイズを 5-10%減少させた一方で、HDAC3 の KD は大顎サイズを 13%-20%増加させ、2 つの HDAC は拮抗的な作用を示した。大顎の他にも、全 20 部位を計測した結果、HDAC1 の KD では後翅がやや大きくなり、HDAC3 の KD ではやや小さくなる(約 5%)ことがわかり、大顎への効果とは逆の効果を示すことがわかった。しかし、統計的に優位であったものの、翅への効果は大きくなく、ノックダウンの他の器官への効果は検出されなかった(5%以下)。このことから、エピゲノム状態への摂動は大顎で最も大きな影響が見られることが明らかになった。



考察

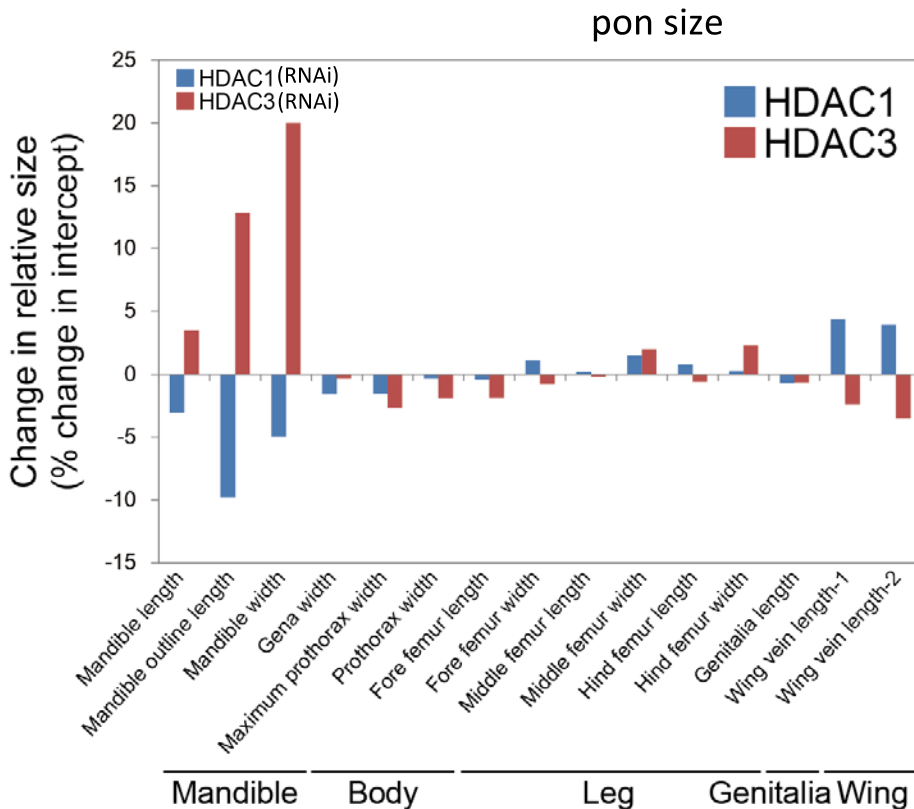
インスリン経路の機能解析から、武器の発生起源がことなるカブトムシの角とオオツノコクヌストモドキの大顎で共通したしくみが存在し、インスリン経路が武器の栄養応答性制御に広く用いられていることが示唆された。さらに、オオツノでは5種類のインスリン様ペプチドが存在するが、そのうちのひとつのみ (ILPA) が武器サイズ制御に強く関わっており、構造が似た遺伝子のなかでも機能の特殊化が生じており、特定のインスリンペプチドが武器サイズを制御することも明らかになった。昆虫では種ごとに2から7種類ものインスリン様ペプチドを持つが、その機能分担はよくわかっていない(Antonova et al. 2012)。ILPA の武器サイズ制御機能が他の昆虫種や武器形態でも共通しているのかどうかを検討することで、武器の進化や形態の多様化メカニズムの理解につながる可能性があり、今後の課題として期待される。

遺伝子発現解析からは、インスリン経路遺伝子群全体としての発現変動は認められたが、ペプチドや受容体など、当初から注目していた上流因子の発現変動は特定できなかった。遺伝子発現レベルではなくペプチドの分泌レベルで栄養状態が表現されている可能性や、発現変動が見られた経路内の他の遺伝

子 (TSC2 など) のレベルで制御されている可能性もあり、遺伝子ノックダウンと表現型の対応関係は必ずしも当該遺伝子の発現量とは合致しないことも明らかになった。

本研究では、栄養応答遺伝子とは異なる着眼点として、エピジェネティックな機構が器官の発生可塑性を決めている可能性を検討し、ヒストンのアセチル化機構が武器特異的な可塑性を制御している可能性を提示した。本研究では全身にわたり、HDAC を KD することでヒストンのアセチル化を促進し、転写を活性化するような摂動を与えている (ヒストンの高アセチル化が起こっている染色体領域は転写活性が高い)。この摂動に対し、大顎組織だけが強く応答したことから (Fig. 4)、大顎組織はヒストンのアセチル化状態が変化しやすいような状態にある可能性がある。つまり、組織発生レベルで可塑性の高い大顎は、細胞のエピゲノム状態が遷移しやすい状態にあり、多様な遺伝子と表現型の発現を可能にしている、いう仮説である (Ozawa, Okada et al. 2016)。

本研究では、栄養条件を武器サイズに反映する分子実体として、ILPA をはじめとするインスリン経路の関与を示したが、部位特異性はインスリン経路だけでは説明できないこともわかってきた。インスリン経路遺伝子の挙動だけでなく、組織ごとのエピゲ



ノム状態の変わりやすさが、遺伝子発現の変わりやすさを規定しており、栄養応答因子と協調して武器特異的な栄養応答をもたらしているものと考えている。エピゲノム制御による武器や装飾形質などの部位特異的な発達は、こうした形質を持つ他の動物種で検証することも可能であり、さまざまな動物で検証が進むことで、生物が多様な形態を作る仕組みが解明されてくると期待している。

参考文献

Antonova, Y., Arik, A. J., Moore, W., Riehle, M. R., & Brown, M. R. (2012). Insulin-like peptides: structure, signaling, and function. *Insect Endocrinology*, 63–92.

Emlen, D. J., Warren, I. A., Johns, A., Dworkin, I., & Lavine, L. C. (2012). A mechanism of extreme growth and reliable signaling in sexually selected ornaments and weapons. *Science*, 337(6096), 860–864.

研究の発表

口頭発表

1. 装飾形質の表現型変異のウラにあるエピゲノム機構

岡田泰和(東大 総合文化), 小澤高嶺(東大 総合文化), 嶋田正和(東大 総合文化), 新美輝幸(基生研 進化発生), 岡田賢祐(岡山大 環境生命), 太田邦史(東大 総合文化)

日本応用動物昆虫学会 大阪府立大学 大阪
2016年3月

2. [国際動物学会(ICZ)におけるシンポジウム主催] Evolution of Animal Ornamentation

Yasukazu OKADA (Univ Tokyo) & Devin O'Brien (Univ Montana)

沖縄科学技術大学院大学(OIST), 沖縄 2016年

11月

3. Epigenetic regulation controls the developmental plasticity of ornaments in a broad-horned flour beetle.

Yasukazu OKADA (Univ of Tokyo)

International Conference of Zoology (国際動物学会), 沖縄科学技術大学院大学(OIST), 沖縄
2016年11月

4. 武器サイズ変異を司るゲノム機構

岡田泰和(東大 総合文化), 小澤高嶺(東大 総合文化), 嶋田正和(東大 総合文化), 新美輝幸(基生研 進化発生), 岡田賢祐(岡山大 環境生命), 太田邦史(東大 総合文化)

日本生態学会 早稲田大学 東京 2017年3月

誌上発表

1. Histone deacetylases control module-specific phenotypic plasticity in beetle weapons.

Ozawa T, Mizuhara T, Arata M, Shimada M, Niimi T, Okada K, Okada Y*, Ohta K*.

Proceedings of the National Academy of Sciences (2016) 113: 15042-15047.

2. 昆虫の表現型可塑性のエピゲノム制御 (解説記事)

小澤高嶺, 岡田泰和, 太田邦史 昆虫と自然,
2015年7月号